

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

TAINÁ NEVES FERREIRA

Busca de inibidores de beta-1,3-glucanases em algas marinhas brasileiras

RIO DE JANEIRO

2014

TAINÁ NEVES FERREIRA

Busca de inibidores de beta-1,3-glucanases em algas marinhas brasileiras

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em Química.

Orientadores: Fernando Ariel Genta e Rafael Dias Mesquita

**Rio de Janeiro
2014**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sempre cuidar de mim, principalmente quando o desânimo e as incertezas da vida me afligiam.

Aos meus orientadores Drs. Fernando Ariel Genta e Rafael Dias Mesquita pela orientação e esclarecimentos indispensáveis à elaboração deste trabalho. Em especial ao Drº Fernando que acreditou na minha capacidade, fazendo me enxergar que a carreira acadêmica é repleta de possibilidades.

Ao laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto (LABFISI) – FIOCRUZ e aos amigos que através deste conheci. Caroline Moraes, Raquel Souza, Daniele Castro, Hector Dias, Francisco agradeço pela amizade, conversas e por todas as trocas de experiências que me ajudaram no meu desenvolvimento profissional.

Ao Prof. Dr. José Bonomi Barufi (UFSC) pela ajuda na coleta e classificação de amostras de algas marinhas.

Aos meus familiares, meus pais Vera Lúcia das Neves e Clodomar Ferreira da Silva que sempre me apoiaram e me incentivaram a estudar possibilitando chegar onde estou. Minhas irmãs, Tamiris e Larissa, que sempre acreditaram nas minhas escolhas e me ajudaram no que fosse preciso.

Ao meu marido Francisco de Assis Oliveira de Souza por seu apoio, paciência, amizade, confiança, incentivo e carinho. Seu companheirismo nos momentos bons e ruins foi fundamental para superar os obstáculos que surgissem, principalmente nesses últimos quando as preocupações me abatiam.

As companheiras de trabalho Ana Carolina Nascimento, Laís Clemente e Deanny pelas conversas e brincadeiras compartilhadas. Vocês tornaram boa parte desse período menos cansativo e agradável.

A amiga Letícia pela amizade de todos esses e por acompanhar essa caminhada desde o início.

Às agências CNPq, CAPES, FAPERJ e FIOCRUZ pelos recursos financeiros concedidos.

Aos membros da banca examinadora pela atenção a este trabalho.

EPIGRAFE

“A menos que modifiquemos a nossa maneira
de pensar, não seremos capazes de resolver
os problemas causados pela forma como
nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

β -1,3-glucanases são enzimas responsáveis pela hidrólise de β -1,3-glucanas tendo aquelas papel importante no metabolismo de algas, plantas e fungos. Além disso, são enzimas que participam na digestão de insetos herbívoros e detritívoros. Inibidores de β -1,3-glucanases foram previamente descritos na alga parda *Laminaria cichorioide* (Yermakova SP, *Et al*, 2002). Neste trabalho, realizamos a busca de inibidores de β -1,3-glucanases em algas coletadas na costa brasileira.

Foram coletadas no litoral da Bahia (Arraial d'Ajuda) amostras de algas das espécies *Lobophora* sp., *Colpomenia sinuosa*, *Padina gymnospora* e *Dictyota* sp, as quais foram preservadas em sílica e enviadas para o Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro. As amostras foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e prepararam-se extratos em etanol absoluto, etanol 50% e tampão fosfato 20 mM pH 7. Os extratos foram utilizados em testes de inibição de uma β -1,3-glucanase comercial (do fungo *Trichoderma* sp.). Ensaio de atividade dessa enzima na ausência e presença de inibidores foram padronizados para revelação em microescala com o reagente ácido bicinchonínico.

Os extratos em tampão não apresentaram resultados de inibição satisfatórios, dessa forma os estudos se concentraram nos extratos etanólicos. Todas as algas estudadas apresentaram atividade inibitória em maior ou menor escala. Contudo, observou-se uma grande variação na inibição de acordo com a amostra utilizada. *Padina gymnospora* foi a alga que apresentou os resultados de inibição mais consistentes, e o tratamento com etanol absoluto mostrou-se um procedimento mais adequado para extração dos inibidores.

ABSTRACT

β -1,3-glucanases are enzymes which hydrolyze β -1,3-glucans, being important in the sugar metabolism of algae, plants and fungi. Besides that, these enzymes are important for the digestion of detritivorous and herbivorous insects. β -1,3-glucanase inhibitors have been described in the brown algae *Laminaria cichorioides* (Yermakova SP, *Et al*, 2002). In this work, we searched for β -1,3-glucanase inhibitors in algae from the Brazilian ocean coast.

Samples from four algae species, namely *Lobophora* sp., *Colpomenia sinuosa*, *Padina gymnospora* e *Dictyota* sp, were collected in the coast of Bahia state (Arraial d'Ajuda), preserved in silica gel and sent to the Oswaldo Cruz Institute (Rio de Janeiro). Tissues were homogenized in liquid nitrogen, and then extracted with absolute ethanol, ethanol 50% or phosphate buffer 20 mM pH 7. These materials were used in inhibition tests against a commercial β -1,3-glucanase from *Trichoderma* sp.. Enzyme assays were standardized in micro scale in the presence or absence of inhibitors and revealed with bicinchoninic acid.

Extracts prepared in buffer did not result in consistent inhibitions, so we focused in the ethanolic extracts. All sampled algae showed inhibitory activity to different extents. However, there is a great variation in the results depending on the sample. *Padina gymnospora* showed the better inhibition results, and the treatment with absolute ethanol was more adequate for inhibitor recovering from algae tissues.

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Modelos mostrando como ocorrem as interações entre enzima.....	11
Figura 2. Estrutura dos anômeros α e β da glicose, e de α e β -glicosídeos.....	13
Figura 3. Configurações aberta e fechada da glicose, forma furanosídica e piranosídica, α e β	14
Figura 4. Estrutura de β -Glucanas lineares.....	15
Figura 5. Padrão de ação de glucanases.....	17
Figura 6. Imagens ilustrativas de insetos cujas β -1,3-glucanases já foram estudadas.....	18
Figura 7. Ordens e grupos dos insetos de acordo com sua filogenia.....	19
Figura 8. Estrutura do sistema digestivo de insetos.....	20
Figura 9. Algas utilizadas nos ensaios de inibição.....	27
Tabela 1. Massa das amostras de algas marinhas coletadas em Arraial d'Ajuda.....	28
Tabela 2. Algas e solventes utilizados para preparação dos extratos.....	30
Figura 10. Atividade da beta-1,3-glucanase de <i>Trichoderma</i> sp. na presença de diferentes extratos da alga <i>Lobophora</i> sp.....	32
Figura 11. Atividade da beta-1,3-glucanase de <i>Trichoderma</i> sp. na presença de diferentes extratos da alga <i>Padina gymnospora</i>	33
Figura 12. Atividade da beta-1,3-glucanase de <i>Trichoderma</i> sp. na presença de diferentes extratos da alga <i>Colpomenia sinuosa</i>	34

Figura 13. Atividade da beta-1,3-glucanase de <i>Trichoderma</i> sp. na presença de diferentes extratos da alga <i>Dictyota</i> sp.....	35
Figura 14. Atividade da beta-1,3-glucanase de <i>Trichoderma</i> sp. Na presença de extratos etanol e etanol 50% v/v da alga <i>Lobophora</i> sp.....	37
Figura 15. Atividade da beta-1,3-glucanase de <i>Trichoderma</i> sp. Na presença de extratos etanol e etanol 50% v/v da alga <i>Padina gymnospora</i>	37
Figura 16. Atividade da beta-1,3-glucanase de <i>Trichoderma</i> sp. na presença de extratos etanol e etanol 50% v/v da alga <i>Colpomenia sinuosa</i>	38
Figura 17. Atividade da beta-1,3-glucanase de <i>Trichoderma</i> sp. Na presença de extratos etanol e etanol 50% v/v da alga <i>Dictyota</i> sp.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Enzimas e seus Inibidores.....	10
1.2 Beta-1,3-glucanas.....	13
1.3 Beta-1,3-glucanases.....	16
1.4 Estudo da digestão de insetos.....	17
1.5 Inibidores de Beta-1,3-glucanases.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Reagentes.....	23
3.2 Algas.....	23
3.3 Preparação dos extratos de algas.....	23
3.4 Ensaios enzimáticos.....	24
3.5 Detecção de produtos de reação com ácido dinitrosalicílico (DNS).....	25
3.6 Detecção de produtos de reação com o reagente Ácido bicinchonínico (BCA).....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Coleta de macroalgas marinhas e preparação de extratos.....	26
4.2 Ensaios preliminares de inibição da atividade de beta-1,3-glucanase.....	31
5. CONCLUSÕES.....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas e seus Inibidores

Enzimas são, em grande parte, proteínas conhecidas como catalisadores biológicos. Assim sendo, aumentam a velocidade de reações químicas, diminuindo a energia de ativação que é necessária para a conversão dos reagentes, neste caso substratos, em produtos. Entretanto, diferentemente dos catalisadores químicos, esse processo depende da disposição de grupos funcionais no sítio ativo da enzima, local onde a catálise ocorrerá.

Uma das características de destaque das enzimas é a sua especificidade em relação ao substrato. O sítio de ligação entre o substrato e a enzima é descrito com uma cavidade na superfície da enzima de formato semelhante ao reagente (complementaridade geométrica) e que possui ainda certa organização de resíduos de aminoácidos que atraem especificamente o substrato (complementaridade eletrônica). As ligações entre enzima e substrato acontecem devido a interações de van der Waals e de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Esses aspectos são fundamentos do modelo “chave-fechadura”(Voet, D. e cols, 2008).

No entanto, é importante ressaltar que este modelo mostrou-se incapaz de explicar algumas interações enzimáticas em particular. Dessa forma, em 1959, foi apresentado o modelo de encaixe induzido ou modelo de Koshland, o qual explica que a associação entre enzima e substrato é mais dinâmica. Ao combinar-se com a enzima, o substrato induz transformações estruturais no centro ativo da enzima, permitindo a posterior ligação entre ambos. Assim sendo, o substrato desempenha um papel importante na determinação do formato do sítio ativo e também na estrutura final do complexo enzima-substrato (Voet, D. e cols, 2008). A Figura 1 simboliza como ocorrem essas interações nos dois modelos.

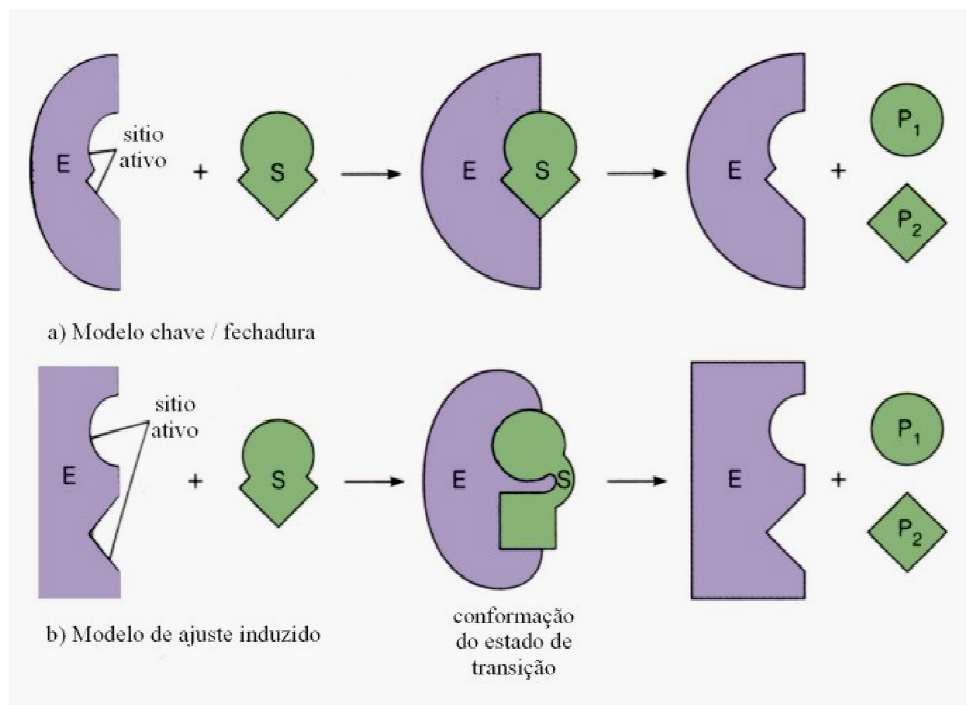


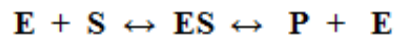
Figura 1 – Modelos mostrando como ocorrem as interações entre enzima e substrato. (a) modelo “chave-fechadura” (b) encaixe induzido. Imagem retirada de: <http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/enzimas.html>.

Já a inibição enzimática ocorre quando existem substâncias que diminuem a atividade catalítica. Os inibidores podem alterar a atividade de maneira irreversível (inativadores) ou reversível. No primeiro caso há uma ligação intensa ou reação química entre inibidor e enzima tornando a mesma inativa, enquanto no segundo tipo o inibidor interage de maneira reversível com a proteína, podendo apresentar estrutura semelhante a do substrato.

Para melhor compreender os processos de inibição reversível é importante destacar que estes podem ocorrer de diferentes maneiras (Segel, I, 1993), entre as quais podemos destacar: (A) inibição competitiva, (B) acompetitiva e (C) não-competitiva.

A. Inibição competitiva

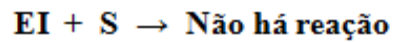
Neste primeiro tipo uma substância de composição semelhante ao substrato se liga ao sítio ativo, porém não é capaz de reagir com este. Ou seja, concorre de modo direto com substrato e com isso minimiza a concentração de enzima disponível para a reação. O esquema abaixo ilustra como ocorre a inibição competitiva:



+

I

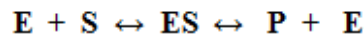
↕



Onde E representa enzima, S substrato, ES complexo enzima-substrato, P produto, I inibidor e EI complexo enzima-inibidor (Voet, D. e cols, 2008).

B. Inibição acompetitiva

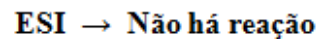
Neste outro caso não é necessário que a substância seja semelhante ao substrato, pois esta se liga espontaneamente ao ES. Esse tipo de inibição é explicado pela possível distorção que o inibidor provoca no sítio ativo, deixando a enzima inativa pra catálise. Um novo diagrama ajuda a compreender esse processo:



+

I

↕

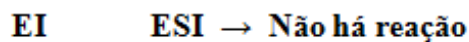
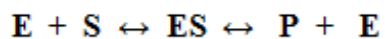


No qual ESI representa o complexo enzima-substrato-inibidor.

Como podemos observar o inibidor influencia na atividade catalítica, mas não na sua união do substrato com a proteína. Com isso, podemos dizer que substrato e inibidor interagem com regiões diferentes da enzima.

C. Inibição não-competitiva

Esses inibidores são capazes de se ligar tanto à enzima livre quanto ao complexo enzima-substrato, fazendo com que esta perca a atividade catalítica. O esquema abaixo mostra como seria a atuação do inibidor:



1.2. Beta-1,3-glucanas

Glucanas são polissacarídeos formados por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas. Tais ligações diferenciam-se entre α e β , conforme a Figura 2. Assim, podemos classificá-las como α ou β -glucanas.

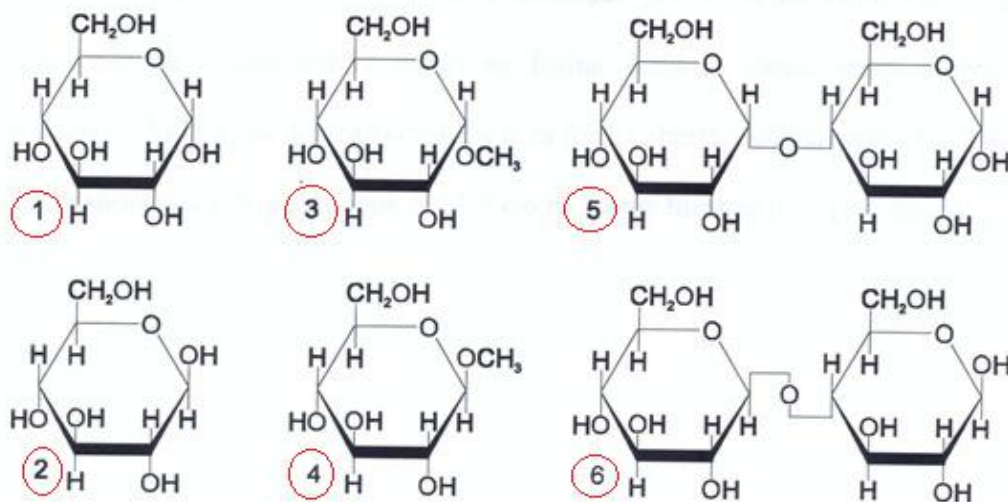


Figura 2 – Estrutura dos anômeros α e β da glicose (estruturas 1 e 2) (forma piranosídica), 1-O-metil-glicosídeos (estruturas 3 e 4), maltose (4-O- α -D-glicopiranosil-D-glicopiranoose, estrutura 5) e celobiose (4-O- β -D-glicopiranosil-D-glicopiranoose, estrutura 6) (Genta, F.,2000).

Referente à ligação glicosídica em glucanas a mesma é formada através de reação de polimerização do tipo condensação entre o grupo hidroxila ligado ao carbono 1 (anomérico) de uma glicose na forma cíclica e uma outra hidroxila de um carbono diferente de outra

glicose. Tomando como exemplo a molécula de glicose em sua forma cíclica vemos que existem diferentes possibilidades de ligação com grupo –OH tanto na forma piranosídica (cinco átomos de carbono no ciclo) quanto na furanosídica (quatro átomos de carbono no ciclo), de acordo com Figura 3.

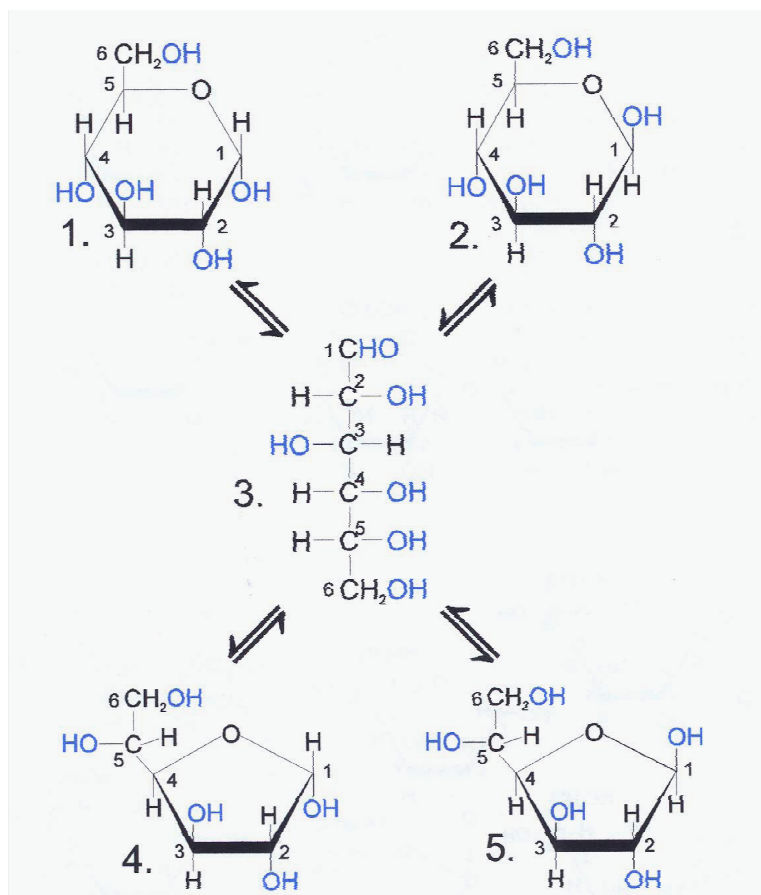


Figura 3 – A molécula de glicose nas configurações aberta (3 - projeção de Fischer), α -piranosídica (1), β -piranosídica (2), α -furanosídica (4), β -furanosídica (5). Os grupos hidroxilas em azul são os que podem ser substituídos (Genta, F.,2000).

Entretanto por questões de incompatibilidade no alongamento da cadeia as ligações (1 \rightarrow 1), (1 \rightarrow 5) de piranoses e (1 \rightarrow 4) de furanoses não são formadas em glucanas (Figura 3).

Desta maneira, as ligações que ocorrem em polissacarídeos no formato de piranoses de β -glucanas são (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 6). A Figura 4 mostra como seria a estrutura de alguns polissacarídeos lineares com suas respectivas ligações glicosídicas.

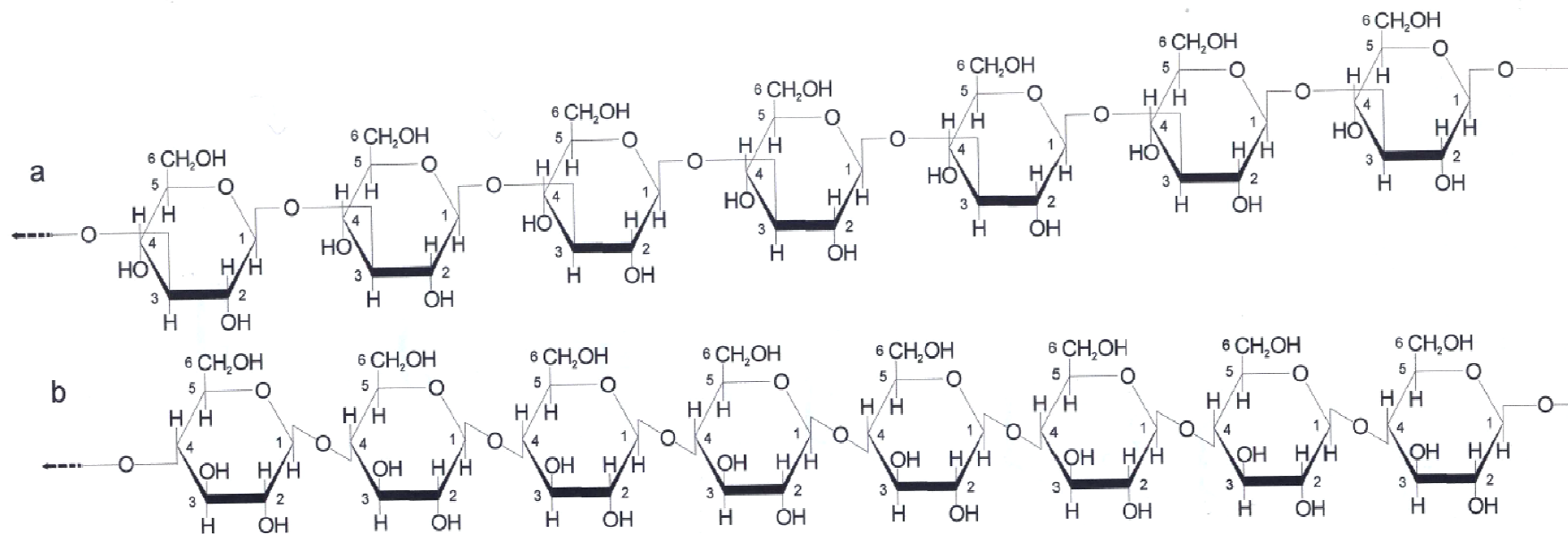


Figura 4 - Estrutura de β -Glucanas lineares (a) Laminarina (Beta(1-3) glucana linear) e (b) Celulose (Beta(1-4) glucana linear) (Genta, F.,2000).

Para o substrato utilizado nesse trabalho, a β -1,3-glucana, também chamada de laminarina, a ligação entre os monômeros se dá entre os carbonos 1 e 3, conforme ilustrado na figura anterior. Há uma variedade desses polissacarídeos na natureza, ocorrendo principalmente em algas, plantas superiores e fungos. Nos fungos é possível encontrá-los na composição da parede celular conforme Gorin e Spencer 1968; Bartnicki-Garcia 1968; Wessels e Sietsma 1981 citado por Genta, F., 2000.

A ligação β -1,3 também se apresenta em glucanas mistas como β -1,3-1,4-glucanas também conhecidas como liquenana (polissacarídeos de cereais como aveia e cevada), ou ainda β -1,3-1,6-glucanas (existente em fungos) de acordo com Bragatto 2011; Morral e Briggs 1978; Bacic e cols. 1988.

Com relação às propriedades químicas de β -glucanas, pode-se dizer que as diferenças relacionadas às ligações β e a estrutura química são determinantes em relação à variação de solubilidade e atividade biológica em geral. Entretanto, estudos evidenciaram que polissacarídeos ramificados tendem a apresentar maior solubilidade em solventes polares como a água enquanto que cadeias lineares exibem tendência à formação de coloides (gel) (Aspinall, 1982 apud Genta, F., 2000).

1.3. Beta-1,3-glucanases

As β -glucanases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas em β -glucanas. A catálise ocorre predominantemente sobre substratos de cadeia longa e quando a atividade ocorre preferencialmente sobre glicosídeos estas passam a ser conhecidas como β -glicosidases. Tais proteínas, no geral, apresentam um pH ótimo de catálise ácido, que vai de 4,5 a 6,5 de acordo com Schomburg and Salzmann, 1991 citado por Genta, F., 2000.

Essas enzimas podem ser classificadas conforme variações na estrutura ou na atividade catalítica. Um dos principais aspectos é a especificidade já que as mesmas são seletivas em relação ao polissacarídeo hidrolisado. Ou seja, existem diferentes enzimas que catalisam a hidrólise de ligações em β (1 \rightarrow 3), β (1 \rightarrow 4) ou β (1 \rightarrow 6)-glucanas.

Outra diferença importante é com relação ao padrão de ação que se dá de acordo com sítio de clivagem no polissacarídeo, sendo as enzimas divididas em endoglucanases ou exoglucanases. Endoglucanases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas nas porções internas da cadeia,

liberando oligossacarídeos, ou seja, produtos de alto grau de polimerização, enquanto exoglucanases clivam os resíduos presentes nas porções externas da cadeia, liberando monômeros de glicose ou dissacarídeos. A figura 5 ilustra como acontecem os diferentes ataques sobre o substrato.

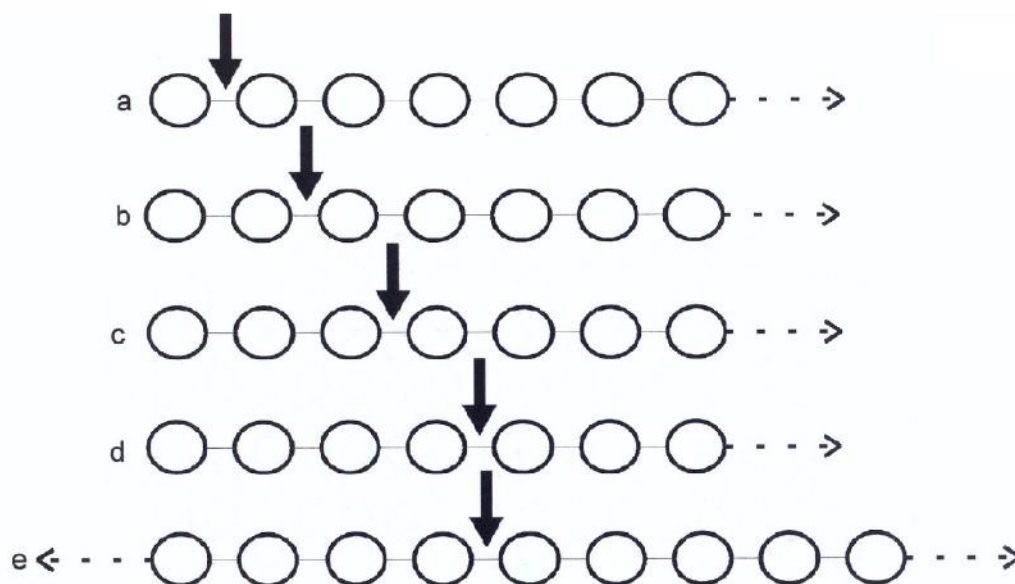


Figura 5 – Representação gráfica do ataque de glucanases com diferentes padrões de ação. A seta representa as ligações que serão rompidas. As figuras de (a) até (d) representam exoglucanases; (e) representa endoglucanases (Genta, F. 2000).

Essas enzimas são produzidas por fungos filamentosos e leveduriformes, e assim como bactérias, apresentando amplas aplicações biotecnológicas.

1.4. Estudo da digestão de insetos

As β -1,3-Glucanases são frequentemente encontradas no tubo digestivo de insetos detritívoros ou que se alimentam de gramíneas sendo então provável que essas enzimas desempenhem importante função no processo de digestão dos mesmos (Moraes, C. 2012). Reforçando essa hipótese já se detectou que β -1,3-glucanases são amplamente distribuídas em insetos de várias ordens, tal como, *Periplaneta americana* (Blattodea; Genta cols. 2003), *Tenebrio molitor* (Coleoptera; Genta 2009), *Abracris flavolineata* (Orthoptera; Genta cols. 2007), *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera; Erthal Jr. e cols.2007), *Helicoverpa armigera*

(Lepidoptera; Pauchet e cols. 2009), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Bragattoe cols. 2010) e várias espécies de cupins (Isoptera; Lucena e cols. 2011). A figura 6 mostra a aparência desses insetos com seus nomes populares. A figura 7 ilustra as ordens de insetos com seus respectivos nomes populares.

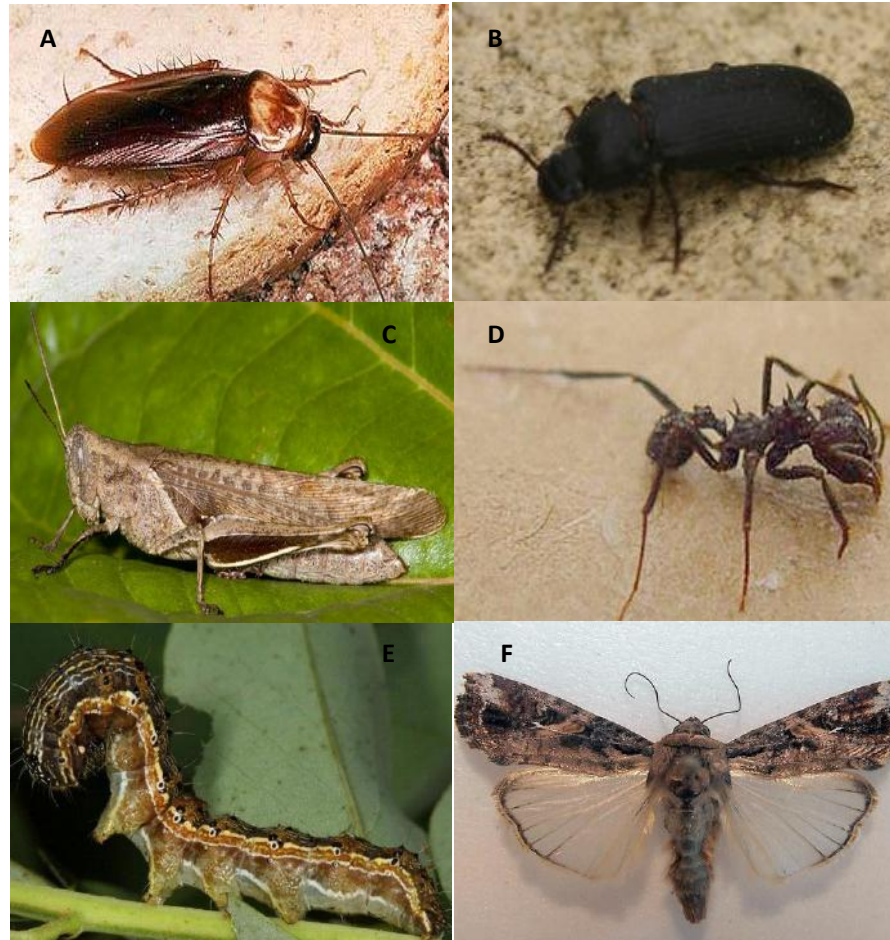


Figura 6 – Imagens ilustrativas de insetos cujas β -1,3-glucanases já foram estudadas. (A) *Periplaneta americana* – barata (<http://goo.gl/ExRRtb>); (B) *Tenebrio molitor* – besouro (<http://goo.gl/fzsJF7>); (C) *Abracris flavolineata* – gafanhoto (<http://goo.gl/DkE1Wv>); (D) *Acromyrmex subterraneus* – formiga saúva (<http://goo.gl/a4WSiD>); (E) *Helicoverpa armigera* – lagarta de mariposa (<http://goo.gl/HqDIZe>); (F) *Spodoptera frugiperda* – mariposa (lagarta do cartucho do milho; <http://goo.gl/P38Yu3>).

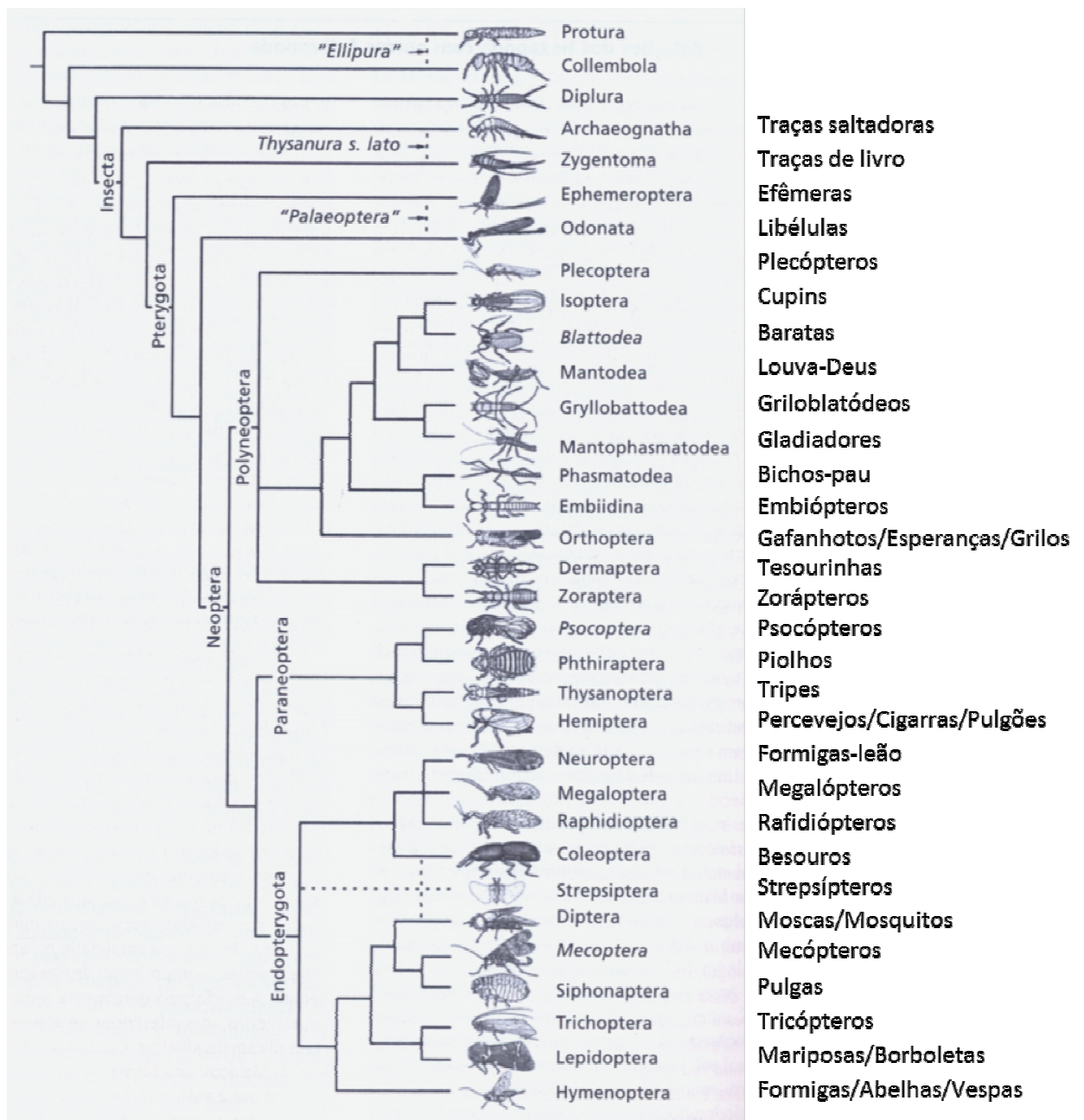


Figura 7 – Ordens e grupos dos insetos de acordo com sua filogenia. Ao lado, os nomes populares em português de representantes de cada ordem. (Fonte: Gullan e Cranston, 2007).

A digestão de polissacarídeos em insetos tem como principal objetivo a produção de glicose usada como fonte energética. Além disso, a digestão dessas moléculas pode ajudar na passagem mais eficiente do alimento no sistema digestivo, pois isso levaria à redução do bolo

alimentar, já que polissacarídeos tendem a formar agregados de alta viscosidade, de acordo com Danicke e cols.(1999) citado por Genta F. (2000).

O sistema digestivo de insetos pode ser separado em três partes: intestino anterior, médio e posterior (ver Figura 8). As porções anterior e posterior são revestidas internamente por quitina, não secretam enzimas nem absorvem nutrientes. Já na porção média acontece a digestão química, pois é o local onde há secreção de enzimas e absorção de nutrientes.



Figura 8 – Estrutura do sistema digestivo de insetos. (Fonte: Moraes, C. 2012).

É importante destacar que nos insetos o intestino é a maior superfície de contato e trocas com o meio externo que é acessível a agentes externos de controle. Sabendo disso, é importante investir em estudos relacionados à fisiologia digestiva de insetos transmissores de doenças ou pragas agrícolas, de forma a desenvolver novas formas de controle desses organismos.

1.5. Inibidores de β -1,3-glucanases

Já se sabe que um dos mecanismos de defesa de plantas contra predadores é a produção de substâncias que minimizem o ataque destes. Dentre estas, podemos destacar produção de inibidores que agem sobre as enzimas digestivas.

Trabalhando essa hipótese, foram iniciados estudos com inibidores de β -1,3-glucanase, os quais foram descritos e isolados a partir de algas marinhas, especialmente de algas pardas (Ermakova e cols., 2001 e Yermakova e cols., 2002) já que as mesmas utilizam desta estratégia de defesa contra predação por animais marinhos. Segundo Yermakova, S. (2002):

Laminarinas (β (1-3) e (1-6)-glucanas) são polissacarídeos de reserva de algas marinhas marrons amplamente distribuídas em organismos marinhos. Elas cumprem funções análogas às do amido em plantas terrestres. Seria lógico supor que as algas, assim como as plantas terrestres, possuem defesas contra o ataque de organismos que se alimentam das mesmas.

Segundo os artigos detectou-se a ação inibidora de algas marinhas marrons sobre β -1,3-glucanases de moluscos marinhos. Dos 21 tipos de algas estudadas 14 apresentaram capacidade de inibição acima de 50%, mas devido à abundância de *Laminaria cichorioides* na costa japonesa, local onde foi coletada, e à sua alta porcentagem de inibição, 95%, esta foi escolhida para isolamento de inibidores por procedimentos de cromatografia líquida de alta resolução e eletroforese.

Desta maneira, avaliando a importância que beta-1,3-glucanases possuem na fisiologia de insetos, o isolamento de inibidores dessas enzimas obtidos de algas marinhas brasileiras pode representar um importante avanço tecnológico na busca de novos alvos de inibição da sua digestão, tendo em vista o controle de populações de pragas agrícolas e de vetores de doenças.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Busca de inibidores de beta-1,3-glucanases de insetos presentes em algas marinhas brasileiras.

2.2. Objetivos Específicos

- Coleta de algas pardas no litoral brasileiro;
- Preparação de extratos etanólicos e aquosos;
- Padronização de ensaios enzimáticos;
- Padronização de ensaios de inibição;
- Rastreamento da presença de inibidores nos extratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Para preparação dos extratos das algas foi utilizado Etanol absoluto (Merck), água MilliQ (Millipore) e tampão fosfato de sódio (PBS, Sigma). Nos ensaios enzimáticos usou-se o substrato: Laminarina proveniente de *Laminaria digitata* (Sigma N° Cat. L9634) e a beta-1,3-glucanase de *Trichoderma* sp. (Sigma N° Cat. L5272). Para revelação dos ensaios usaram-se os reagentes Ácidos dinitrosalicílico (DNS, Sigma N° Cat. D0550) e bicinchonínico (BCA, Sigma N° Cat. D8284).

3.2. Algas

Macroalgas pardas foram recolhidas em março de 2012 no litoral de Arraial d'Ajuda, Porto Seguro, Bahia, pelo Prof. José Bonomi Barufi (UFSC). Foram coletadas algas das espécies *Colpomenia*, *Dictyota*, *Lobophora* e *Padina*. As algas foram enviadas ao laboratório em tubos de 15 mL com sílica gel em seu interior.

3.3. Preparação dos extratos de algas

As algas foram colocadas na estufa a 37°C por um dia para desidratação, sendo em seguida, o seu conteúdo pesado. O material de cada tubo foi dividido em três partes e guardado em microtubos de 1,5 mL no freezer a -20°C.

Para preparo dos extratos, foi utilizada uma mesma amostra já dividida em três partes, as quais foram pesadas e cada uma dessas foi misturada a um dos três solventes, etanol PA, solução água/etanol 50% (v/v) ou tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7. Esse procedimento está especificado na Tabela 2. Ao todo foram preparados nove extratos de cada alga, sendo três em etanol absoluto, três em etanol 50% e três em tampão fosfato 20 mM pH 7.

Cada um dos materiais foi macerado com almofariz e pistilo em nitrogênio líquido, sendo em seguida, adicionados 2 mL de um dos solventes citados. Os macerados em etanol e etanol 50% foram mantidos em temperatura ambiente para extração durante três dias. Os macerados em tampão fosfato foram mantidos a 4°C. Após a extração, os extratos foram centrifugados a

4°C por 10 segundos a 2.000 g, sendo coletada a fração solúvel. Essas amostras foram mantidas, até a sua utilização, em criotubos fechados evitando a evaporação do solvente em freezer a -20°C.

3.4. Ensaios enzimáticos

Para os ensaios foram preparadas soluções estoque de beta-1,3-glucanase (0,1 mg/mL) em solução tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7 e de substrato laminarina (0,5%, p/v) em água milliQ. Para cada ensaio foram preparadas misturas de reação controles e experimentais.

Para experimentos relativos a extratos em etanol absoluto, os controles continham 5 µL de laminarinase, 5 µL de laminarina e 5µL de etanol absoluto mais 10 µL tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7. Para experimentos relativos a extratos em água/etanol 50% (v/v), os controles continham 5µL de laminarinase, 5 µL de laminarina e 5 µL de solução água/etanol 50% (v/v), mais 10µL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7. Para experimentos relativos a extratos em tampão fosfato, os controles continham 5 µL de laminarinase, 5 µL de laminarina e 15 µL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7.

As misturas de reação experimentais foram preparadas da mesma forma que os controles acima: 5 µL de laminarinase mais 5 µL de laminarina e 10 µL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7, porém no lugar das alíquotas de 5 µL de solvente foram adicionados 5 µL do respectivo extrato.

Em um segundo momentos foram realizados ensaios utilizando diluições dos extratos em etanol e etanol 50% em tampão fosfato de sódio 20 mM (1 parte de extrato: 9 partes de tampão). Nesses casos os controles foram montados usando as diluições correspondentes de cada solvente em tampão. O volume final de todas as misturas de reação (controles e experimentais) foi de 25µL.

Para cada ensaio foram preparadas cinco réplicas conforme descrito acima em micro tubos e sob baixa temperatura (banho de gelo). Após a montagem, os tubos foram incubados no termociclador ou banho Maria sob temperatura de 30°C e cada réplica foi retirada a cada 15 minutos, ou seja, nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 min. Cada tubo foi mantido sob refrigeração a -20°C até a revelação (itens 3.5 e 3.6).

3.5. Detecção de produtos de reação com ácido dinitrosalicílico (DNS)

A revelação de produtos de reação (açúcares redutores) com o reagente DNS foi feita de acordo com Lucena e cols., 2013. Em resumo, foram adicionadas às réplicas do ensaio 20µL do reagente e após isso, os tubos foram incubados no termociclador a 99°C durante 5 minutos para revelação. Foram tiradas alíquotas de 27 µL do volume total as quais foram transferidas para microplacas de 96 poços, sendo estas lidas no espectrofotômetro sob comprimento de onda de 550 nm.

3.6. Detecção de produtos de reação com o reagente Ácido bicinchonínico (BCA)

A revelação de produtos de reação (açúcares redutores) com o reagente BCA foi feita de acordo com Lucena e cols., 2013. Em resumo, foram adicionadas às réplicas do ensaio 50 µL do reagente e após isso, os tubos foram incubados no termociclador a 80°C durante 25 min. para revelação. Foram tiradas alíquotas de 27 µL do volume total as quais foram transferidas para microplacas de 96 poços, sendo estas lidas no espectrofotômetro sob comprimento de onda de 562 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Coleta de macroalgas marinhas e preparação de extratos.

Foram coletadas algas de quatro espécies marinhas, no litoral de Arraial d'Ajuda (Bahia). Na coleta foram obtidos exemplares das algas *Lobophora* sp., *Colpomenia sinuosa*, *Padina gymnospora* e *Dictyota* sp. A coleta foi realizada pelo Prof. José Bonomi Barufi (UFSC), que classificou os exemplares e depositou espécimes na coleção de macroalgas da UFSC. Os materiais obtidos foram acondicionados em sílica gel e enviados para o Rio de Janeiro, aonde foram separados, pesados e acondicionados em microtubos de polipropileno a -20°C. A Figura 9 mostra aparência das algas citadas.



Figura 9 – Algas usadas nos ensaios de inibição. À esquerda estão as fotos das algas após coleta e envio para o laboratório (Fiocruz), e à direita fotos ilustrativas de cada espécie, no ambiente marinho. (A) *Colpomenia* (<http://goo.gl/r8EdD9>), (B) *Dictyota* (<http://goo.gl/rUH8JB>), (C) *Lobophora* (<http://goo.gl/2E6iSF>), (D) *Padina* (<http://goo.gl/4HTEXd>).

Os dados relativos aos materiais obtidos encontram-se na tabela 1. Ao todo foram obtidas 29 amostras, sendo 9 de *Lobophora*, 7 de *C. sinuosa*, 9 de *P. gymnospora* e 4 de *Dictyota* (Tabela 1).

Tabela 1 – Massa das amostras de algas marinhas coletadas em Arraial d’Ajuda. Massa 1- peso úmido da amostra recebida após a coleta (incluindo sílica gel e areia). Massa 2 – peso do tecido vegetal após remoção da areia e da sílica.

<i>Lobophora sp.</i>			<i>Colpomenia sinuosa</i>		
Nº	Massa 1 (g)	Massa 2 (g)	Nº	Massa 1 (g)	Massa 2 (g)
1	0,5347	0,3751	1	0,3954	0,2881
2	0,6274	0,4225	2	0,3703	0,3038
3	0,6321	0,5419	3	0,4044	0,3754
4	0,6466	0,4446	4	0,4212	0,4082
5	0,492	0,2965	5	0,5452	0,4063
6	0,6059	0,4394	6	0,3758	0,3563
7	0,6624	0,4451	7	0,4218	0,3248
8	0,4213	0,3372			
9	0,4504	0,2929			
<i>Padina gymnospora</i>			<i>Dictyota sp.</i>		
Nº	Massa (g)	Massa (g)	Nº	Massa 1 (g)	Massa 2 (g)
1	0,9766	0,793	1	0,3368	0,3336
2	0,8441	0,6725	2	0,2943	0,2849
3	1,3467	1,164	3	0,2488	0,2259
4	1,0539	0,8156	4	0,2528	0,2391
5	0,8346	0,6759			
6	0,915	0,7827			
7	0,9201	0,7413			
8	0,917	0,7201			
9	0,8893	0,7102			

A partir dessas amostras, foram preparados extratos etanólicos (etanol absoluto ou etanol 50%) e extratos em tampão, totalizando 36 extratos, sendo 12 extratos em cada tipo de solvente utilizado.

Tabela 2 – Algas e solventes utilizados para preparação dos extratos. As amostras “não utilizadas” não foram usadas para extração, materiais secos guardados a -20°C.

Lote	Espécie da alga	Massa (g)	Solventes	
1	<i>Colpomenia sinuosa</i>	0,0946	Etanol Absoluto	
		0,0475	Etanol 50% v/v	
		0,1416	Tampão fosfato 20 mM pH 7	
2		0,0731	Etanol Absoluto	
		0,0638	Etanol 50% v/v	
		0,0696	Tampão fosfato 20 mM pH 7	
3		0,3754	Não utilizada	
		0,0864	Etanol Absoluto	
4		0,0838	Etanol 50% v/v	
		0,1385	Tampão fosfato 20 mM pH 7	
5		0,4063	Não utilizada	
6		0,3563	Não utilizada	
7		0,3248	Não utilizada	
1		<i>Dictyota sp.</i>	0,0923	Etanol Absoluto
			0,1003	Etanol 50% v/v
	0,0829		Tampão fosfato 20 mM pH 7	
2	0,0704		Etanol Absoluto	
	0,0912		Etanol 50% v/v	
	0,0759		Tampão fosfato 20 mM pH 7	
3	0,0593		Etanol Absoluto	
	0,0660		Etanol 50% v/v	
	0,0703		Tampão fosfato 20 mM pH 7	
4	0,2391		Não utilizada	
1	0,3751		Não utilizada	
2	0,4225		Não utilizada	
3	0,5419		Não utilizada	
4	0,1333		Etanol Absoluto	
	0,1314		Etanol 50% v/v	
	0,1293	Tampão fosfato 20 mM pH 7		
5	0,2965	Não utilizada		
6	0,4394	Não utilizada		
7	0,4451	Não utilizada		
8	0,1192	Etanol Absoluto		
	0,0704	Etanol 50% v/v		
	0,1144	Tampão fosfato 20 mM pH 7		
9	0,1156	Etanol Absoluto		
	0,0826	Etanol 50% v/v		
	0,0677	Tampão fosfato 20 mM pH 7		
1	<i>Padina gymnospora</i>	0,1888	Etanol Absoluto	
		0,1890	Etanol 50% v/v	
		0,1567	Tampão fosfato 20 mM pH 7	
2		0,6725	Não utilizada	
3		1,1640	Não utilizada	
4		0,8156	Não utilizada	
5		0,6759	Não utilizada	
6		0,7827	Não utilizada	
7		0,1861	Etanol Absoluto	
		0,2767	Etanol 50% v/v	
		0,1887	Tampão fosfato 20 mM pH 7	
8		0,1958	Etanol Absoluto	
		0,2585	Etanol 50% v/v	
		0,1869	Tampão fosfato 20 mM pH 7	
9		0,7102	Não utilizada	

4.2. Ensaios preliminares de inibição da atividade de beta-1,3-glucanase

Tendo preparado os extratos descritos na Tabela 2, decidimos testar se estas amostras têm atividade inibitória sobre beta-1,3-glucanases. Como enzima padrão, escolhemos a beta-1,3-glucanase de *Trichoderma* sp., por ser uma enzima disponível comercialmente e com atividade sobre laminarina facilmente detectável. A laminarina é uma beta-1,3-glucana de alga parda, *Laminaria digitata*, substrato comercialmente disponível e de baixo custo.

Os ensaios preliminares realizados com a enzima de *Trichoderma* sp. e diferentes extratos produzidos são apresentados nas figuras 10 a 13. Inicialmente, vale destacar que a grande maioria dos ensaios mostrou um incremento de absorbância linear ao longo do tempo, sugerindo que a enzima de *Trichoderma* sp. é estável nas condições de ensaio e que estas permitem a medida da velocidade inicial de reação entre enzima e substrato. Além disso, os controles de cada um dos experimentos (Figuras 10A, 11A, 12A e 13A) mostraram-se semelhantes, embora tenha sido observada uma variação entre os ensaios ($0,0027 \pm 0,0002$ Abs./min nos controles com etanol absoluto, $0,0032 \pm 0,0004$ nos controles com etanol 50%). Isso demonstra que os ensaios enzimáticos são reprodutíveis. A variação da Absorbância no tempo total utilizado é de cerca de 0,4 unidades, suficiente para que possa ser observada inibição da enzima, visto que uma atividade até dez vezes menor poderia ser medida com acurácia em um espectrofotômetro regular. Apesar dessas observações, é possível perceber certa variação na absorbância basal dos ensaios (0,2 a 0,6 unidades de Absorbância), o que pode estar relacionado a diferenças no reagente de BCA usado para revelação ou nas microplacas usadas para leitura. Observando-se os resultados dos ensaios na presença de extratos das macroalgas (Figuras 10B-D, 11B-D, 12B-C, 13B-C) verificamos inibição em relação aos controles (Figuras 10A, 11A, 12A e 13A) nos ensaios com extratos preparados em etanol absoluto e etanol 50 %. Nos ensaios realizados com extratos preparados em tampão fosfato (Figuras 10D e 11D), não foi observada redução da atividade da beta-1,3-glucanase de *Trichoderma* sp.

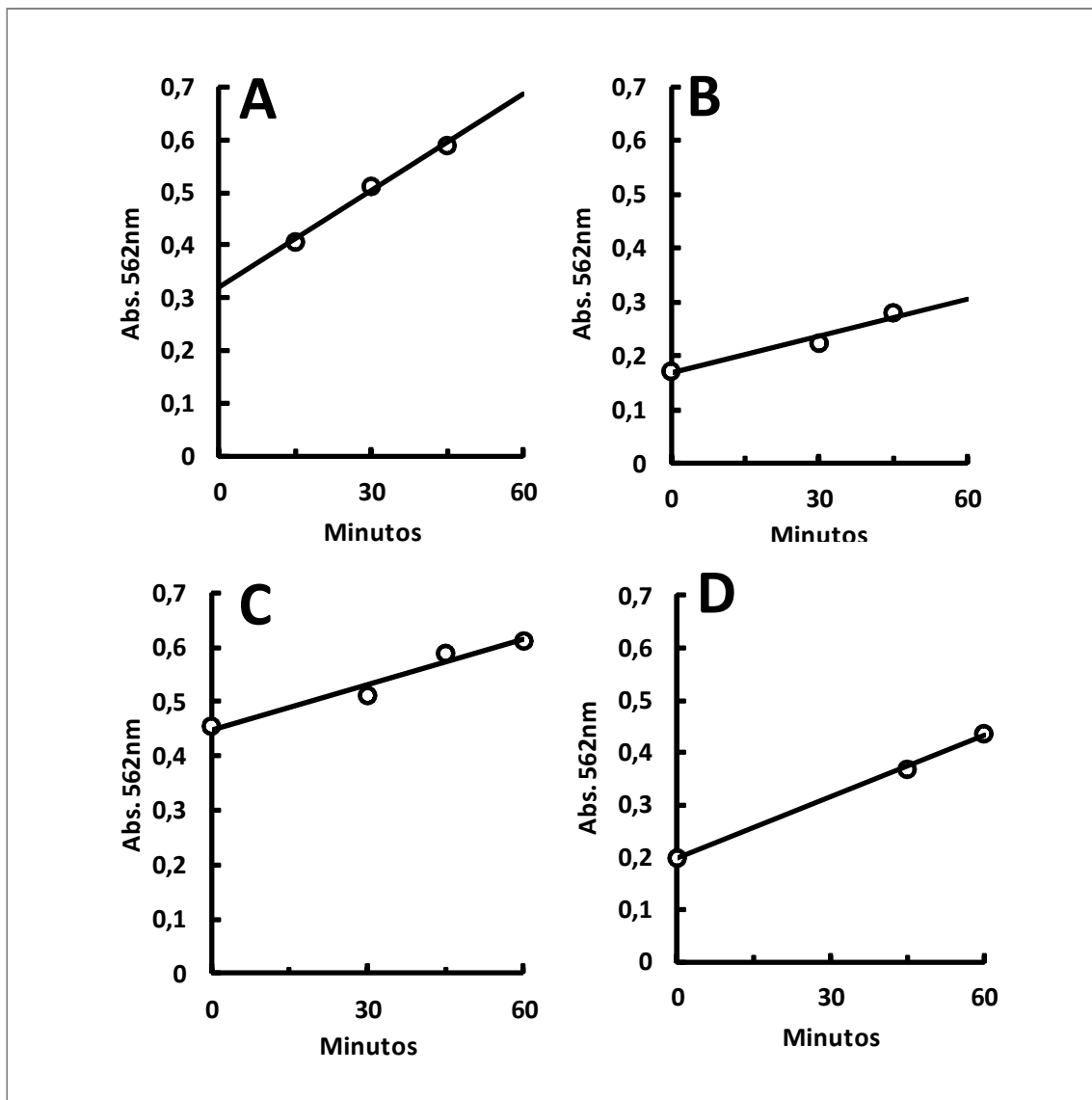


Figura 10 – Atividade da beta-1,3-glucanase de *Trichoderma* sp. na presença de diferentes extratos da alga *Lobophora* sp. (A) Ensaio controle; (B) Extrato etanólico; (C) Extrato em Etanol 50%; (D) Extrato em tampão fosfato 20 mM pH 7. Para mais detalhes ver Material e Métodos. Não foram observadas diferenças significativas controles em etanol, etanol 50% ou tampão.

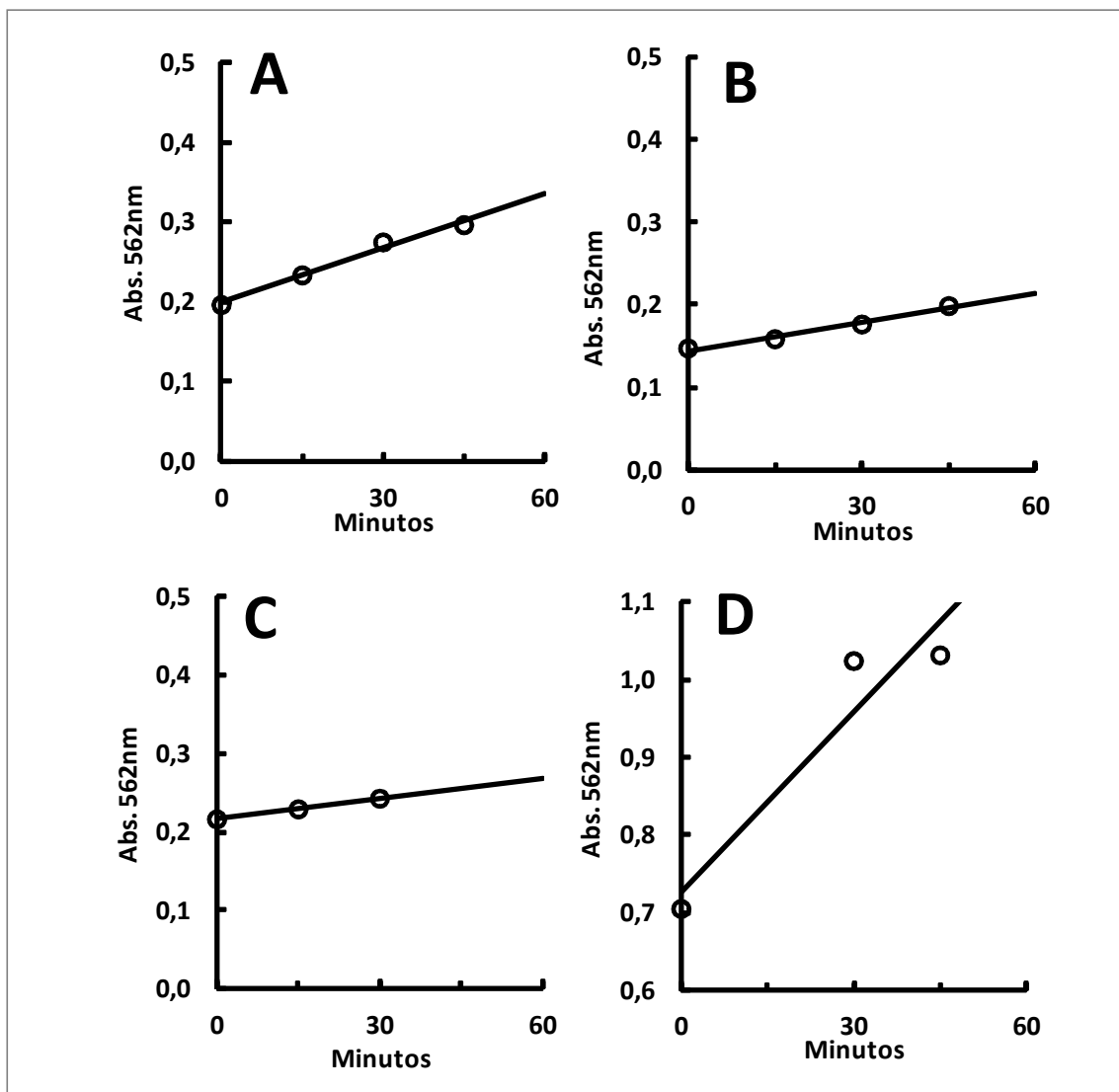


Figura 11 – Atividade da beta-1,3-glucanase de *Trichoderma* sp. na presença de diferentes extratos da alga *Padina gymnospora*. (A) Ensaio controle; (B) Extrato etanólico; (C) Extrato em Etanol 50%; (D) Extrato em tampão fosfato 20 mM pH 7. Para mais detalhes ver Material e Métodos. Não foram observadas diferenças significativas controles em etanol, etanol 50% ou tampão.

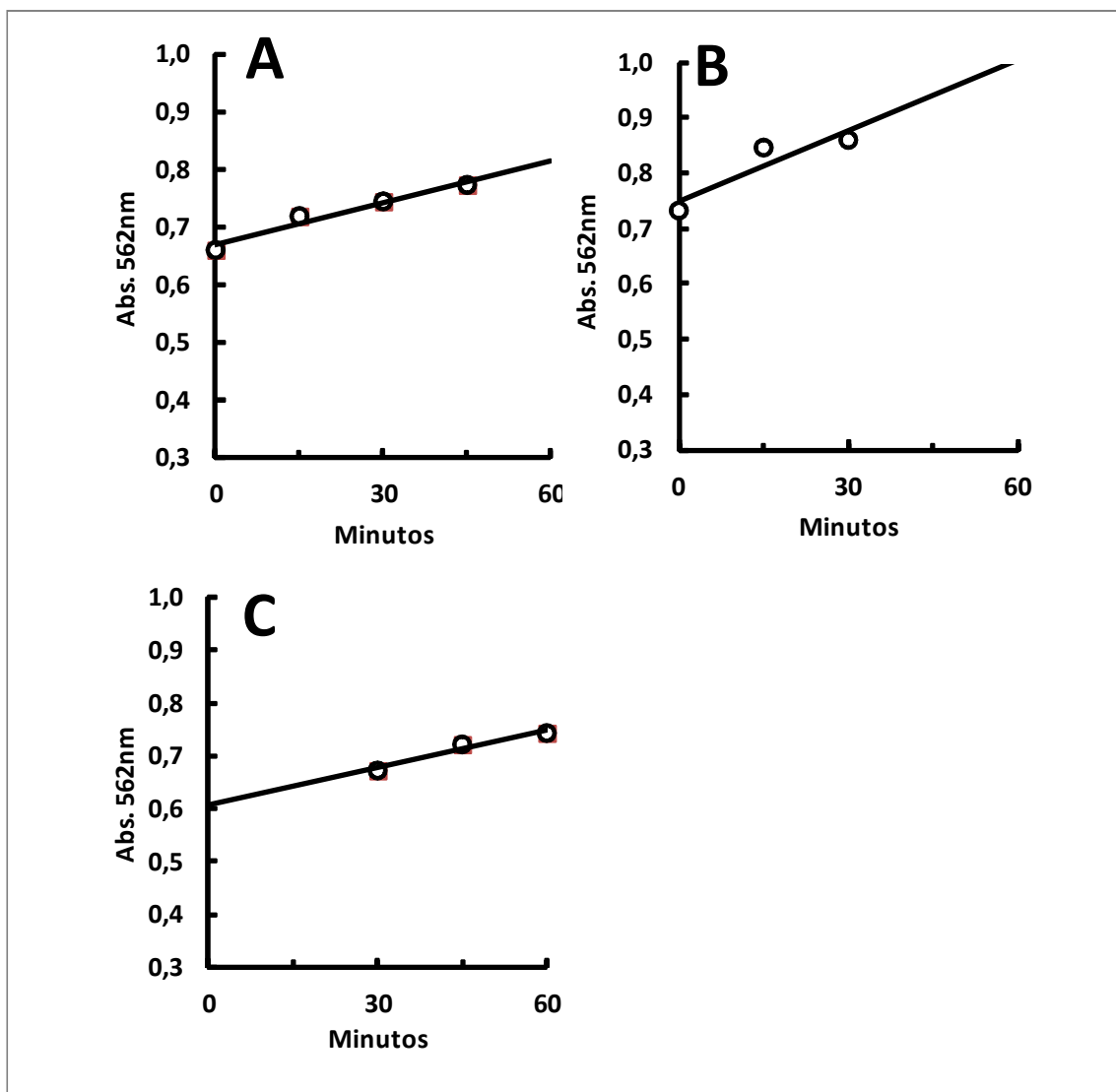


Figura 12 – Atividade da beta-1,3-glucanase de *Trichoderma* sp. na presença de diferentes extratos da alga *Colpomenia sinuosa*. (A) Ensaio controle; (B) Extrato etanólico; (C) Extrato em Etanol 50%. Para mais detalhes ver Material e Métodos. Não foram observadas diferenças significativas controles em etanol ou etanol 50%.

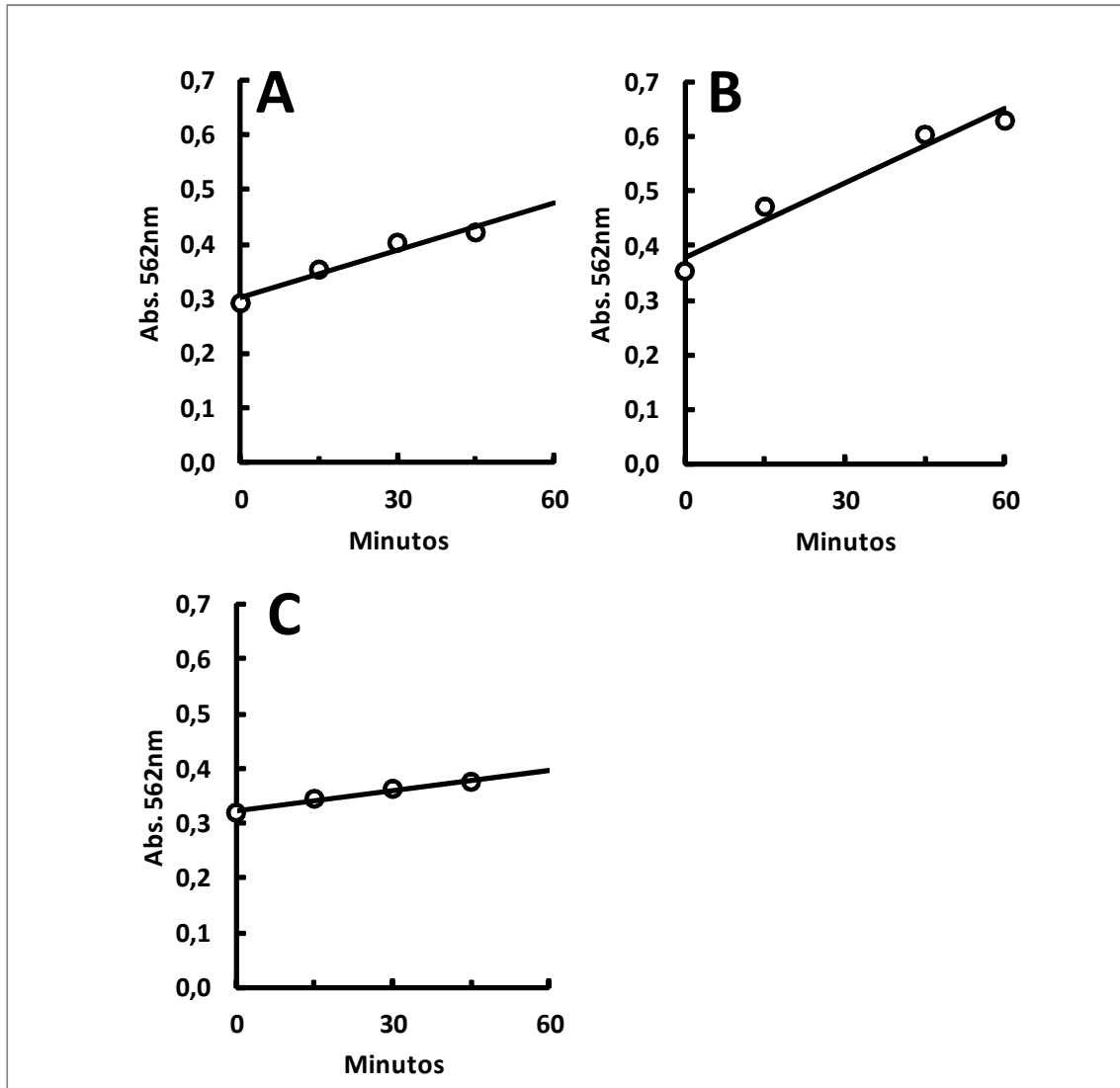


Figura 13 – Atividade da beta-1,3-glucanase de *Trichoderma* sp. na presença de diferentes extratos da alga *Dictyota* sp. (A) Ensaio controle; (B) Extrato etanólico; (C) Extrato em Etanol 50%. Para mais detalhes ver Material e Métodos. Não foram observadas diferenças significativas controles em etanol ou etanol 50%.

De posse dos dados preliminares acima, decidimos realizar mais dois ensaios de inibição com extratos em etanol absoluto e etanol 50% de cada alga e não mais com extrato de tampão fosfato, por essa razão, nas figuras 12 e 13 não constam esses gráficos. Resumos de todos os dados obtidos para cada alga estão apresentados nas Figuras 14 a 17. Inicialmente, observamos que a inibição causada pelo extrato varia muito entre diferentes lotes da mesma alga. Por exemplo, extratos em etanol absoluto de *Colpomenia sinuosa* causaram 100 % de inibição ou não afetaram a atividade da beta-1,3-glucanase de *Trichoderma* sp (Figura 16). De uma maneira geral, extratos em etanol absoluto das algas *Lobophora*, *Padina* e *Dictyota* foram capazes de inibir a beta-1,3-glucanase, e apenas os extratos em etanol 50% da alga *Padina* mostraram resultados consistentes de inibição dessa enzima. Dessa forma, aparentemente o preparo dos extratos em etanol absoluto resulta em incubações dos inibidores de beta-1,3-glucanases a partir das algas estudadas mais reprodutíveis. Isso sugere que esses inibidores extraídos dessas algas podem ter um caráter mais hidrofóbico, o que seria consistente com o fato de as interações entre beta-1,3-glucanases e seus substratos são predominantemente de natureza hidrofóbica.

É importante considerar que as variações observadas na inibição entre os extratos obtidos a partir da mesma alga podem estar relacionadas a heterogeneidades nas preparações iniciais, pois o material recebido poderia estar constituído de diferentes partes do talo ou corpos de frutificação dos vegetais coletados. Além disso, é possível que os lotes do material coletado correspondam a algas sob diferentes microclimas (temperatura da água, luminosidade, submersão contínua ou esporádica) ou regimes de predação (ataque por moluscos ou crustáceos). Ermakovae cols. (2001) e Yermakova e cols. (2002) descreveram o mesmo fenômeno a partir de extratos da alga *Laminaria cichorioides*, com inibições da enzima do molusco *Spisulasa chalinensis* variando entre 5 e 100%. Nesse caso, pôde-se perceber uma diferença na presença de inibidores nos extratos dessa alga em função da estação do ano. No caso das algas estudadas no nosso trabalho, seria necessário um estudo mais sistemático de cada alga para definir quais parâmetros determinam a presença do inibidor. Entretanto, de uma forma geral, a alga que apresentou os resultados de inibição mais consistentes, nos dois tipos de extrato estudados foi a alga parda *Padina gymnospora*.

Contudo, como os extratos foram obtidos a partir de amostras de cada uma das algas com diferentes massas em peso seco, variando em até 5,4 vezes, será necessário normalizar os dados em função das quantidades de material biológico para confirmar as observações acima.

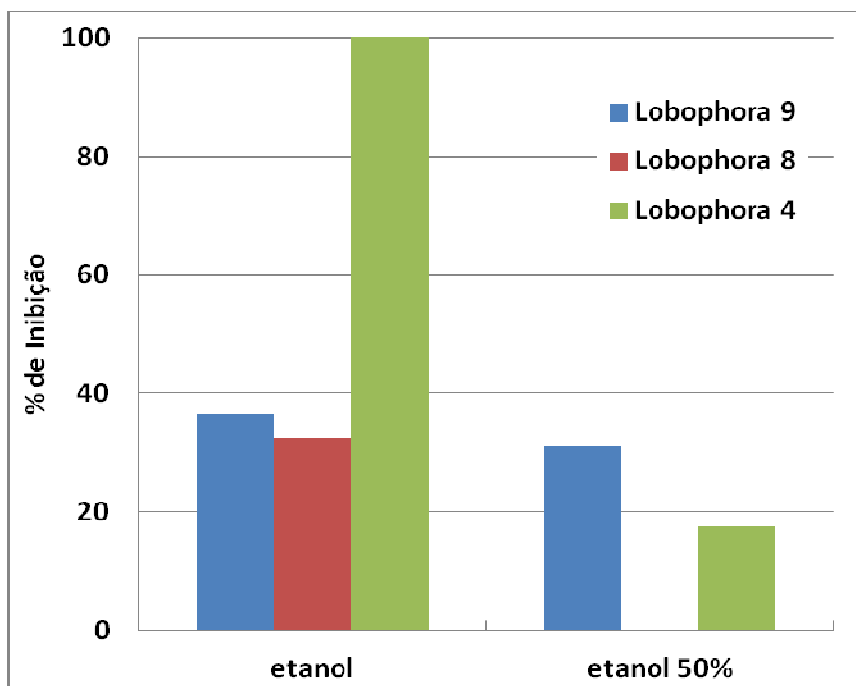


Figura 14 – Atividade da β -1,3-glucanase de *Trichoderma* sp. na presença de extratos etanol e etanol 50% v/v da alga *Lobophora* sp.

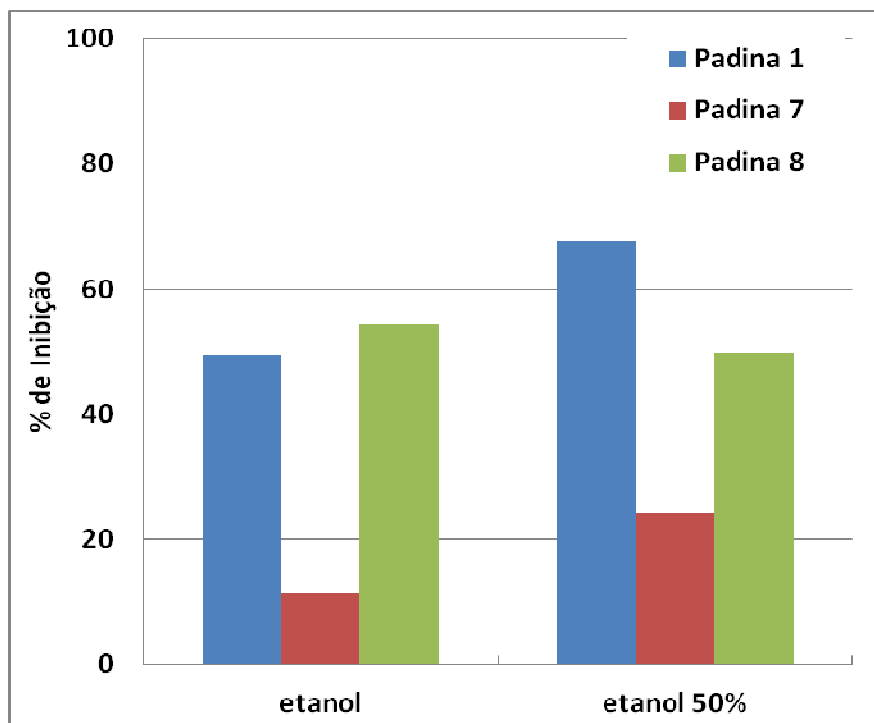


Figura 15 – Atividade da β 1,3-glucanase de *Trichoderma* sp. na presença de extratos etanol e etanol 50% v/v da alga *Padina gymnospora*.

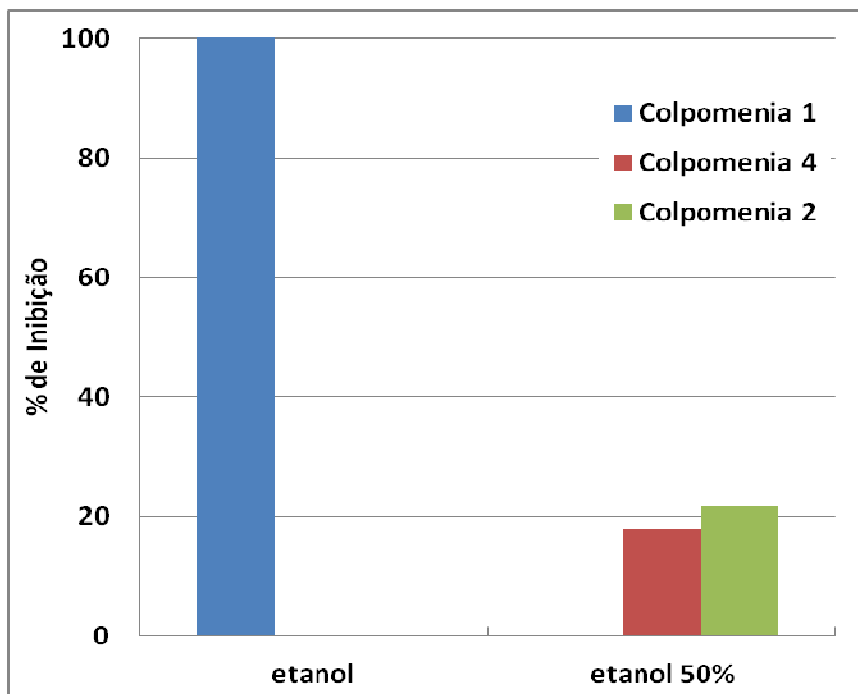


Figura 16 – Atividade da β -1,3-glucanase de *Trichoderma* sp. na presença de extratos etanol e etanol 50% v/v da alga *Colpomenia sinuosa*.

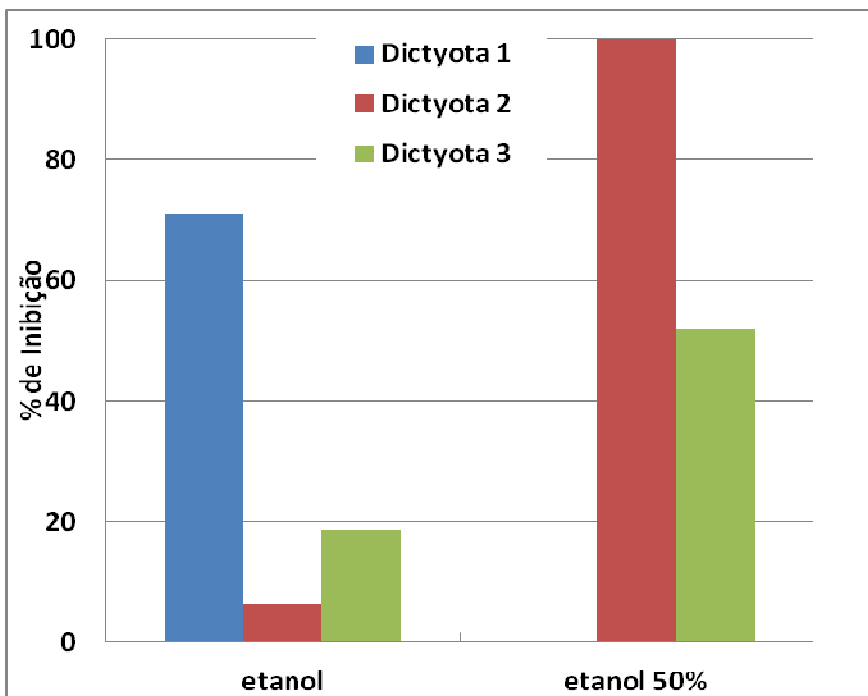


Figura 17 – Atividade da β -1,3-glucanase de *Trichoderma* sp. na presença de extratos etanol e etanol 50% v/v da alga *Dictyota* sp.

Após a padronização dos ensaios de inibição com a enzima comercial *Trichoderma* sp., foram realizados testes de inibição de atividade enzimática presente em extratos de intestinos de larvas de flebotomíneos *Lutzomyia Longipalpis*. Contudo, em função do tamanho diminuto do inseto, a pequena quantidade de enzima recuperada a partir do material biológico não permitiu a realização de testes adequados. Dessa forma, o estudo da influência de inibidores de algas nas β -1,3-glucanases desses insetos necessita inicialmente da produção dessas enzimas em sistema heterólogo, para que se possa fazer rastreamento em larga escala.

5. CONCLUSÕES

- Algas pardas das espécies *Lobophora* sp., *Padyna gymnospora*, *Colpomenia sinuosa* e *Dictyota* sp. possuem substâncias capazes de inibir a beta-1,3-glucanase de *Trichoderma* sp.
- A presença de inibidores de beta-1,3-glucanase nas algas *Dictyota* sp., *Lobophora* sp. e *Colpomenia sinuosa* é heterogênea, dependendo da amostra biológica usada para o extrato.
- Das algas estudadas, *Padina gymnospora* foi a única que apresentou inibição da beta-1,3-glucanase em todos os extratos testados.
- Dos solventes testados, etanol absoluto apresentou os resultados mais reprodutíveis na extração de inibidores de algas pardas.
- Testes de inibição das beta-1,3-glucanases de *L. Longipalpis* a partir de amostras biológicas mostraram-se inviáveis. Nesse sentido a produção heteróloga dessas enzimas é necessária para a continuação dos estudos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aspinall, G.O. (Ed.), 1982. The Polysaccharides. Vols. 1 e 2. New York: Academic Press. 340 e 503p.

Bacic A, Harris PJ, Stone BA. Structure and function of plant cell walls. In: Stumpf, PK, Conn EE (Eds), The Biochemistry of Plants Academic Press, New York 1998 .p.297-371.

Bartnicki-Garcia S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. Annual Review of Microbiology 1968; 22:87-108.

Bragatto I, Genta FA, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C. Characterization of a β -1,3-glucanase active in the alkaline midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae and its relation to β -glucan-binding proteins. Insect Biochemistry and Molecular Biology 2010; 40(12): 861-872.

Bragato I. Sequências, propriedade e função de β -1,3-glucanases de insetos. São Paulo. Tese [Doutorado em Bioquímica] – Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2011.

Danicke, S., Dusel, G., Jeroch, H., Kluge, H., 1999. Factors affecting efficiency of NSP-degrading enzymes in rations for pigs and poultry. Agribiological Research 52: 1-24.

Ermakova S. P., Burtseva Yu. V., Burtseva, Sova V. V., Kratchun V. V. e T. N. Zvyagintseva. Brown Proteins of Brown Seaweeds as Inhibitors of Endo 1 \rightarrow 3- β -D-glucanases of Marine Invertebrates. Biochemistry (Moscow), Vol. 66, No. 2, 2001, pp. 188-194.

Erthal M Jr, Peres Silva C, Ian Samuels R. Digestive enzymes in larvae of the leaf cutting ant, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). Journal of Insect Physiology 2007; 53(11):1101-1111.

Genta, F.A., 2000. Purificação e Caracterização de β -glucanases digestivas de *Periplaneta americana* (Dictyoptera). Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Genta FA, Terra WR, Ferreira C. Action pattern, specificity, lytic activities, and physiological role of five digestive β -glucanases isolated from *Periplaneta americana*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 2003; 33(11), 1085-1097.

Genta FA, Dumont AF, Marana SR, Terra WR, Ferreira C. The interplay of processivity, substrate inhibition and a secondary substrate binding site of an insect α -D-glucanase. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1774(9): 1079-1091.

Genta, F.A., Bragatto, I., Terra, W.R., Ferreira, C., 2009. Purification, characterization and sequencing of the major β -1,3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 861-874.

Gorin PA, Spencer JF. Structural chemistry of fungal polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry* 1968; 23:367-417.

Gullan, P.J., Cranston, P.S., 2007. *Os Insetos. Um Resumo de Entomologia*. São Paulo: Roca. 3ª Ed. 440p.

Lucena AS, Lima LS, Cordeiro LSA, Sant'anna C, Constantino R, Azambuja P, de Souza W, Garcia ES, Genta FA. High throughput screening of hydrolytic enzymes from termites using a natural substrate derived from sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels* 2011; 4(1):51.

Lucena, S.A., Moraes, C.S., Costa, S.G., de Souza, W., Azambuja, P., Garcia, E.S., Genta, F.A., 2013. Miniaturization of hydrolase assays in thermocyclers. *Analytical Biochemistry* 434: 39–43

Moraes, C.S., 2012. Caracterização molecular e bioquímica de carboidrases digestivas em larvas de *Lutzomyia longipalpis*. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Morral, P., Briggs, D.E., 1978. Changes in cell wall polysaccharides of germinating barley grains. *Phytochemistry* 17: 1495-1502.

Pauchet Y, Freitak D, Heidel-Fischer HM, Heckel DG, Vogel H. Immunity or digestion: glucanase activity in a glucan-binding protein family from Lepidoptera. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(4):2214-2224.

Schomburg, D., Salzmann, M., 1991. *Enzyme Handbook 3*. Berlin: Springer-Verlag. Folhas soltas.

Segel, I., 1993. *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. New York: Wiley, 957p.

Terra, W.R., Ferreira, C., 2005. Biochemistry of Digestion. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds). Comprehensive Molecular Insect Science. Volume 4: Biochemistry and Molecular Biology. p.171-224. Amsterdam: Elsevier.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Fundamentos de Bioquímica. 2^a ed. Artmed, 2008.

Yermakova SP, Sova VV, Zvyagintseva TN, 2002. Brown seaweed protein as an inhibitor of marine mollusk endo-(1-->3)-beta-D-glucanases. Carbohydr Res. 337:229-37.

Wessels J, Siestma J. Fungal cell walls: a survey. In: Tanner W, Loewus F. (Eds.) Encyclopedia of Plant Plant Physiology, New Series, Vol.13B, Plant Carbohydrates II, p352-394. Berlin: Springer-Verlag.